

대한구강악안면병리학회지. 2003 ; 27(1) : 25~35

구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체 발현

배경진, 최정희, 김은정, 이은주, 김진

연세대학교 치과대학 구강병리학교실, 구강종양연구소, Brain Korea 21 의과학 사업단

〈ABSTRACT〉

Expression of the TGF- β 1 type II receptor in oral squamous cell carcinoma cell lines

Kyung Jin Bae, Jung Hee Choi, Eun Jung Kim, Eun Ju Lee, Jin Kim

Department of Oral Pathology, Oral Cancer Research Institute, Yonsei university College of Dentistry,
Brain Korea 21 Project for Medical Science

The imbalance between epithelial cell growth and inhibitory factors may cause human epithelial cancer. The dysregulation of growth inhibitory effect of TGF- β 1 has been recognized in a variety of carcinomas. This study aimed to investigate the expression of TGF- β 1 type II receptors(T β R-II) in the carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma(OSCC). Six cell lines established from OSCC in the department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry were used. DNA was extracted from harvested cells by phenol-chloroform method. Polymerase chain reaction (PCR) was done with each primer of exon 3, 4, 5, 6 of T β R-II gene. PCR products were inserted to cloning vector (pGEM-T easy vector) and then analyzed to automatic DNA sequencing analyzer. Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) was performed to confirm the mRNA expression of T β R-II gene. Western blotting was performed to detect the expression of the T β R-II protein.

As results, a frameshift within a polyadenine region of exon 3 was found in YD-8 cell line. In YD-17 cell line, a missense mutation at codon 238 of exon 4 was found, suggesting the alteration of amino acid from asparagine to aspartic acid. T β R-II mRNA was detected in all cancer cell lines, but it was slightly decreased as compared to that of normal oral mucosal cells. In Western blotting, no T β R-II protein was detected in all OSCC cell lines. These results suggested that the altered regulation of TGF- β 1 function might play a role in the development of OSCC.

Key words : Oral squamous cell carcinomas, TGF- β 1, TGF- β 1 type II receptor gene's mutation

통신저자 : 연세대학교 치과대학 구강병리학교실, 구강종양연구소 김진

이 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (02-PJ1-PG3-20801-0015)의 지원으로 수행되었음.

I. 서론

구강암은 전체 암종의 3~5%정도로, 이중 편평세포암종이 약 90%를 차지하고 전세계적으로 매년 40만명이 발병하고 있다¹⁾. 구강점막의 편평세포암종 발생은 발암물질에 노출된 부위에 유전적인 손상이 지속적으로 축적되어 암세포로의 전환이 일어나며, 정상조직으로부터 세포의 증식을 거쳐 이형성이 진

행되면서 상피내암을 거쳐 침윤성 성장에 이르는 다단계 과정을 거치게 된다^{2,3)}.

구강점막을 구성하는 중층편평상피는 외부 자극으로 탈락되며 기저층에서 지속적인 세포분열을 하여 각화세포로의 분화를 반복하는 조직으로서, 세포의 성장과 분화를 조절하는 인자들, 즉 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 그 수용체, 억제인자(transforming growth factor, TGF- β)와 그 수용

체등에 의해 항상성이 유지된다. 따라서 상피세포 성장인자와 억제인자간의 불균형은 편평세포암종을 일으키는데 관여할 것으로 생각한다^{4,5)}.

TGF- β 의 수용체에는 type I, type II, type III (betaglycan), type IV, type V 등이 있다^{6,7)}. TGF- β 1 type II 수용체(T β R-II)는 serine/threonine kinase를 갖는 75-85kDa의 막단백질로서 TGF- β 와 직접 결합하며, 신호서열(signal sequence), 9개의 cysteine이 존재하는 136개의 아미노산으로 이루어진 세포외 영역, 단일막 영역, 376개의 아미노산으로 이루어진 kinase 활성을 갖는 길다란 세포내 영역등 총 365개의 아미노산으로 이루어지며, 스스로 인산화된다⁷⁾. 세포내 영역은 주로 kinase 영역으로 이루어지며, 2개의 짧은 insert를 가진다. Insert 1은 codon 366에서 374부위로서 kinase의 catalytic center에 근접해 있으며, 별다른 역할을 하지 않는 것으로 밝혀졌고, insert 2 부위는 codon 490에서 508에 위치하며, kinase 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 즉, 인산화가 일어나는 부위로서 type I 수용체와의 신호전달 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다^{8,9)}.

TGF- β 1 type I 수용체(T β R-I)는 T β R-II 와는 다르게 리간드와 직접 결합하지 못한다. T β R-I는 TGF- β 가 T β R-II 에 결합된 후 이것들과 복합체를 형성하여 인산화되고 세포안으로 신호를 전달하게 된다^{6,7,10~13)}. 활성화된 T β R-I의 kinase 영역은 Smad라고 부르는 세포내 신호전달 매개물질을 인산화시키는데, 먼저 Smad2와 Smad3가 인산화되고 Smad4가 함께 결합되어 Smad 복합체를 형성하고 핵으로 이동한다^{14~16)}. 핵안에서 Smad 복합체는 DNA에 결합하여 특정 유전자의 전사를 돕는다¹⁷⁾.

구강을 포함하는 두경부에 발생하는 편평세포암종의 발생 과정은 정상 조직에서 전암 병소 단계를 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 과정에서 상피세포 성장수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)의 발현이 점진적으로 증가하는 것이 알려져 있으며, 특히 암 발생의 위험이 없는 조직과는 달리 암종 주위의 정상 조직에서도 높은 빈도로 과발현되어 발암

과정에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다^{4,8)}. 그러나, 구강 편평세포암종의 경우에는 TGF- β 1 수용체의 발현 및 T β R-II 유전자의 돌연변이에 관한 연구가 거의 없는 실정이다. 또한, 한국인의 구강 편평세포암종의 발생과정은 지역 및 인종 차이로 서구인과 다르다는 점에서 저자는 본 실험실에서 확립한 구강 편평세포암종 세포주를 대상으로 TGF- β 1 수용체의 유전자 돌연변이 및 mRNA와 단백질 발현 등을 관찰하느로서 구강 편평세포암종 발생과정에서 T β R-II의 역할을 규명하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

이 연구는 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 구강 편평세포암종 환자로부터 확립한 6 예의 구강 암종 세포주를 대상으로 하였다. 확립된 구강 암종 세포주의 병리학적 특징은 Table 1에 정리하였다.

나. 연구 방법

(1) DNA 추출

확립된 구강 암종 세포주로부터 phenol-chloroform 방법으로 DNA를 추출하였다. 이를 요약하면 다음과 같다. 약 1×10^6 의 세포를 trypsin으로 처리한 후 원심분리하여 미세 원심관에 모은 후 400 μ l의 효소완충용액(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 5mM EDTA, 1% SDS, 100 μ l/ml proteinase K)을 첨가하고 37°C에서 흔들면서 24시간 동안 그대로 두었다. DNA의 추출을 위해 200 μ l의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하여 흔든 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하는 과정을 2회 반복하였다. 용액 안에 남아있는 phenol을 제거하기 위해 400 μ l의 chloroform-isoamylalcohol(24 : 1)을 넣고 흔든 후 5분간 13,000 rpm에서 회전시켜 상층액을 취하고 40 μ l 3M sodium

Table 1. Pathologic characteristics of oral squamous carcinoma cell lines

Cell line	Age/ Sex	Primary Site	Histologic finding Differentiation/ Inflammation/ Desmoplasia	p53 mutation codon (exon)
YD-8	46/F	Tongue	Moderately Yes Yes	273 (exon8) Arg → His
YD-9	56/M	Buccal Cheek	Moderately Yes No	No
YD-10B	67/M	Tongue	Moderately Yes Yes	236 (exon7) Tyr → Stop
YD-17	66/M	Mandible	Poorly Focal Yes	No
YD-17M		Lymph Node	Poorly No No	No
YD-38	67/F	Mandible	Moderately Focal Yes	No

acetate와 1ml의 차가운 100% 에틸알콜을 첨가하여 70% 에틸알콜로 2회 세척한 후 건조하여 50~100 μ l의 효소완충용액에 녹인 후, 4℃에서 보관하고 자외선 흡광 분석기로 DNA양을 측정하였다.

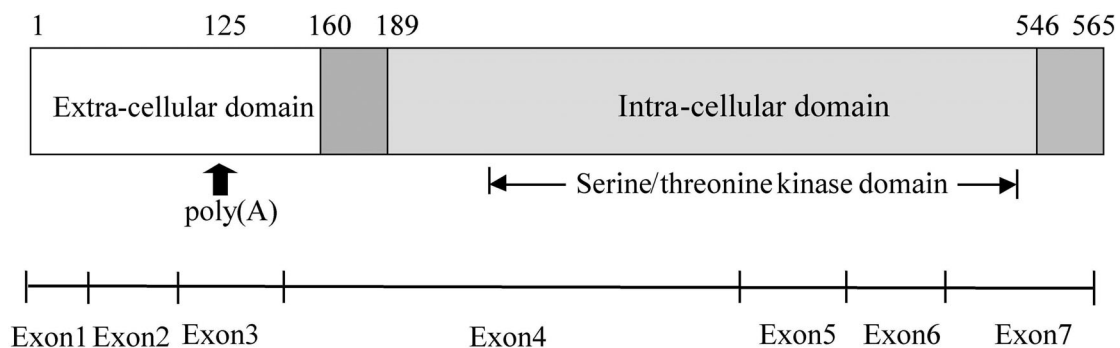
(2) TGF- β 1 type II 수용체 중합효소 연쇄반응

구강 암종 세포주로부터 분리한 DNA를 주형으로 하여 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 poly-adenine 부위와 serine/threonine kinase의 영역(exon 3-6)을 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다 (Fig 1). 암세포주 각각의 DNA 절편 50ng을 사용하여 PCR mixture(Bioneer, Korea)로 반응시켰다. Exon 3-6 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94℃에서 1분, 결합반응은 각각 50℃, 58℃, 55℃, 58℃에서 중합반응은 72℃에서 1분간 40주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 10분간 연장하여 반응시키고 4℃에서 반응을 중지시켰다. 사용한 primer는 Table 2와 같다¹⁹⁾. 중합효소 연

쇄반응의 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하고 자외선을 조사하여 확인하였다.

(3) 클로닝 및 염기서열 분석

TGF- β 1 type II 수용체의 serine/threonine kinase 영역을 포함한 exon 3-6의 중합효소 연쇄반응 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 하였고, 확인된 DNA는 gel extraction kit(Promega, USA)를 이용하여 정제하여, pGEM-T easy vector system(Promega, USA)을 사용하여 모두 클로닝 하였다. 정제된 중합효소 연쇄반응 산물은 pGEM T easy vector에 ligation 시킨 뒤, ligation mixture는 competent DH5 α E. Coli strain에 transformation 시키고, 50 μ g/ml ampicillin과 X-gal/IPTG를 포함한 배지에서 하루동안 배양한 후, 균집을 골라내 plasmid DNA를 QIAGEN plasmid mini prep kit(QIAGEN, Germany)를 사용하여 분리하고, 흡광도를 측정하여 농도를 결

Fig. 1 Structure of TGF- β 1 type II receptor geneTable 2. Sequences of primers for PCR of TGF- β 1 type II receptor

Primer Name	Sequence (5' → 3')	PCR product (bp)
Exon 3-1	TCCAATGAATCTCTTCACTC	241
Exon 3-2	CCCACACCCCTTAAGAGAAGA	
Exon 4-1	CCAACTCCTTCTCTCCTTGTTTTG	445
Exon 4-2	TCCAAGAGGCATACTCCTCATAGG	
Exon 5-1	GGCAGCTGGAATTAAATGATGGGC	261
Exon 5-2	TGCTCGAAGCAACACATG	
Exon 6-1	TTTCCTTTGGGCTGCACATG	242
Exon 6-2	CCTAAGAGGCAACTTGGTTGAATC	

정하였다. pGEM T easy 벡터에 클로닝된 TGF- β 1 type II 수용체의 serine/threonine kinase 영역을 포함한 exon 3-6의 DNA는 pGEM T easy vector의 T7, Sp6 primer를 사용하여 자동화된 염기서열 분석기 (API PRISM® 3700 DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA)로 분석하였다.

(4) mRNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

구강 암종 세포주로부터 RNeasy™ kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여, 총 RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotometer)를 이용하여 260nm

에서 흡광도를 측정하였다. cDNA 합성을 위하여 0.5 μ g 의 RNA를 reverse transcriptase(Boehringer Mannheim, Germany)와 oligod(T) primer를 이용하여 42℃에서 1시간 95℃에서 5분간 반응시키고 4℃에서 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA를 대상으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)와 TGF- β type II 수용체 exon 6 primer로 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94℃에서 1분, 결합반응을 58℃에서 1분 중합 반응은 72℃에서 1분간 35주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72℃에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 역전사-중합효소 연쇄반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 영상 분석기(Densitometer, TINA 2.0)를 이용하여 정량하였고, 각 유전자의 발현은 β -actin band의 발현을 기준으로 계산하였다. 사용한 primer와 반응산물의 size는 Table 3과 같다.

(5) T β R II Western blotting

구강편평세포암종 세포주는 RIPA buffer[(150mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail tablet(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany))를 이용하여 모으고, 1,500 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 얻은 cell pellet은 얼음 위에서 1시간 방치하여 세포를 용해시켰다. 세포용해물은 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 상등액을 회수하여 BSA(Bovine serum albumin)로

단백질을 정량분석하였다. 각각의 암종세포주에서 모은 단백질을 10 μ g을 5×SDS sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)에 넣고 5분간 100℃에서 denaturation 시킨 후 10% SDS-polyacrylamide gel에서 120V로 2시간동안 전기영동하고, Semi-dry transfer (Bio-Rad, U.S.A.)에서 30분간 nitrocellulose membrane에 옮겼다. Membrane은 5% skim milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간동안 blocking하고, 1×PBST buffer로 3번씩 5분간 세척하였다. T β R II 일차 항체를 사용하여 2시간 동안 흔들고, 다시 5분 간격으로 1×PBST 용액에서 3회 세척하였다. Membrane은 anti-mouse rabbit 항체가 포함된 용액에서 1시간동안 반응시킨 후, ECL(Enhanced chemiluminescence) detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 감광하여 현상하여 관찰하였다. T β RII 5ng, 50ng을 각각 암세포주와 함께 blotting하여 연구결과를 비교하였다.

III. 연구 결과

(1) T β R-II 유전자의 돌연변이 분석

YD-8 세포주에서는 세포의 영역에 해당하는 exon 3의 codon 125(subdomain V, codon 103-126)에서 한 개의 adenine이 탈락되는 frameshift를 관찰하였다.

YD-17 세포주에서는 exon 4의 codon 238(subdomain VI)에서 아미노산 asparagine이

Table 3. Sense and antisense primers used and the size of the expected product

Primer	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
T β R II	sense TTTCCTTTGGGCTGCACATG	242
	antisense CCTAAGAGGCAACTTGGTTGAATC	
β -actin	sense GGCGGACTATGACTTAGTTG	238
	antisense AAACAACAATGTGCAATCAA	

aspartic acid(A : T → G : C)로 바뀌는 missense 변이를 관찰하였다.

YD-10B 세포주에서는 exon 4의 codon 168(subdomain VI)에서 아미노산 threonine에는 변화 없이 base(T : A → G : C)가 바뀌는 transversion silent 변이를 관찰하였다. 또한, YD-10B 세포주 exon 4의 codon 206(subdomain VI)에서도 아미노산 threonine에 변화 없이 base(G : C → A : T)가 바뀌는 silent 변이를 관찰하였다. YD-17M 세포주에서도 exon 6의 codon 475(subdomain X, codon 450-500)에서 아미노산 glycine에 변화 없이 base(T : A → C : G)가 바뀌는 silent 변이를 관찰하였다(Fig. 2, Table 4).

모든 세포주(YD-8, YD-9, YD-10B, YD-17, YD-17M, YD-38)에서 TGF- β 1 type II 수용체 exon 5의 codon 439(subdomain IX, codon 425-450) 부위에서 아미노산 alanine이 valine(C : G → T : A)으로 바뀌는 변화를 관찰하였다.

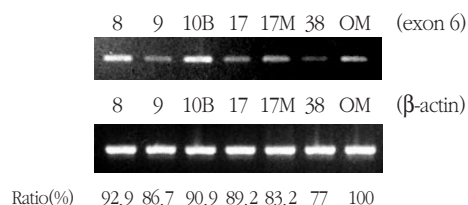


Fig 3. RT-PCR products of T β R-II mRNA

(2) T β R-II mRNA 발현

구강 암종 세포주에서 T β R-II의 mRNA의 발현을 알아보기 위해, 대조 유전자로 β -actin과 T β R-II exon 6 primer를 이용하여 그 발현정도를 관찰한 결과, 모든 세포주에서 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. 그러나, 정상 구강점막 세포와 비교할 때, TGF- β type II 수용체 mRNA의 발현이 다소 감소된 경향을 보였으며, 특히 YD-38 세포주에서는 그 발현이 77%로 뚜렷이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig 3).

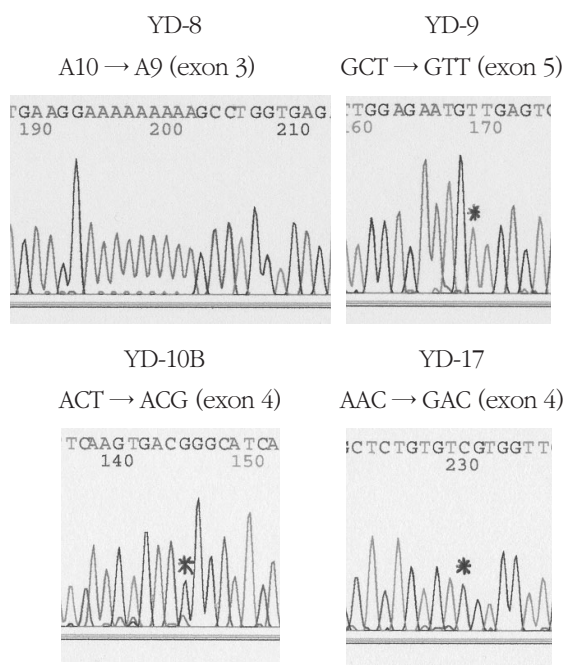


Fig 2. Sequence analysis of T β R-II genes in OSCC cell lines

Table 4. Mutational analysis of T β R-II genes

Cell line	Exons	codon	Base change or Deletion	Amino acid change
YD-8	3	125	"GAA \rightarrow G-A	
	5	439	§CT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-9	5	439	§CT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-10B	4	168	#ACT \rightarrow ACG	Thr \rightarrow Thr
	4	206	#ACG \rightarrow ACA	Thr \rightarrow Thr
	5	439	§CT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-17	4	238	*AAC \rightarrow GAC	Asn \rightarrow Asp
	5	439	§CT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
YD-17M	5	439	§CT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val
	6	475	#GGT \rightarrow GGC	Gly \rightarrow Gly
YD-38	5	439	§CT \rightarrow GTT	Ala \rightarrow Val

" : frameshift mutation, * : missense mutation, # : silent mutation, § : polymorphism



8 9 10B 17 17M 32 38 C (5ng) C (50ng)

Fig 4. Western blot of T β R II protein

(3) T β R II 단백질 Western blotting

T β R-II의 단백질 발현을 관찰한 결과 5ng, 50ng T β R-II를 loading한 양성 대조군에서는 강한 발현을 보인 반면 모든 세포주에서 T β R-II단백질 발현을 볼 수 없었다(Fig.4).

IV. 고찰

TGF- β 는 세포 주기 중 G1 phase에서 Rb (retinoblastoma protein)가 과인산화되는 것을 방지

하여 세포성장 억제효과를 나타낸다. 즉, G1 phase에서 TGF- β 는 c-myc 발현을 억제하거나²⁰⁾, cyclin E의 발현을 억제하게 된다²¹⁾. Cyclin E가 발현된 경우에도 활성화된 cyclin-cdk 복합체의 형성을 방해하여, Rb의 과인산화를 억제함으로써 G1 phase에서 S phase로의 진행을 막아서 세포성장 억제효과를 나타내게 된다²²⁾.

TGF- β 1의 세포성장 억제효과에 대한 저항력이 인체 암 발생의 원인으로 알려져 있으며^{6,23)}, 이러한 저항력을 얻게 되는 기전의 하나로 TGF- β 1 type II 수

용체 유전자의 돌연변이가 다양한 암종 세포주에서 알려져 있다. 특히 식도암, 위암, 대장암 위장관계 암종에서 T β R-II의 돌연변이를 관찰하였다^{24~27}. 위장관계의 암종과는 달리 두경부 암종에서는 T β R II 유전자 변이는 연구가 극히 미미하다. 이 중 Wang등은 두경부 편평세포암종의 22%에서 T β R II 유전자변이가 있음을 확인하고, 돌연변이는 모두 serine/threonine kinase domain에 있었다고 하였고²⁸, Garrigue-Antar등은 두경부 편평세포암종 세포주 8예중 2예에서 T β R II 유전자의 missense 변이를 관찰하였으며, 유전자 돌연변이에 의한 아미노산 변화로 아미노산의 극성변화가 유발되어 단백질의 folding이 영향을 받아서 catalytic 활성이 변함으로써 T β R I 을 인지하는 능력에 장애가 생겨서 세포내 신호전달체계에 이상이 생겼을 것으로 추정하였다⁸. Paterson등은 구강 편평세포암종 세포주 14 예를 대상으로 한 연구에서 1 예의 세포주에서 1개의 adenine base가 poly A tract(bases 709-718, codons 125-128)에 삽입되는 frameshift 변이를 관찰하고, 돌연변이로 인해서 serine/threonine kinase domain(codon 246에서 544)을 갖지 못했을 것으로 추정하였다¹. 이 연구에서는 YD-8 세포주에서 exon 3의 세포의 영역에 해당하는 codon 125(subdomain V, codon 103-126)에서 한 개의 adenine이 탈락되는 frameshift 변이를 관찰할 수 있었고, YD-17에서 exon 4에 missense 돌연변이를 관찰할 수 있었다.

이 연구에서는 missense 변이 이외에 silent 돌연변이가 3 예 있었다. 즉, YD-10B 세포주에서 exon 4의 codon 168(subdomain VI)에서 아미노산 (threonine)에는 변화없이 base(T : A \rightarrow G : C)만 바뀌는 transversion에 의한 silent 변이를 관찰하였다. Transversion에 의한 base 변화는 담배가 원인이 된 구인두암에서 흔히 나타나는 것으로 알려져 있다⁸. 또한, YD-10B 세포주 exon 4의 codon 206 및 YD-17M 세포주 exon 6의 codon 475에서도 silent 돌연변이를 관찰하였다.

TGF- β 1 type II 수용체 exon 5의 codon

439(subdomain IX, codon 425-450)에서 alanine이 valine(C : G \rightarrow T : A)으로 바뀌는 변화는 정상 구강점막 상피세포에서도 관찰되는 다형성(polymorphism)으로 암 발생과는 연관이 없는 것으로 밝혀졌으며^{1,29}, 본 연구에서도 모든 세포주에서 exon 5의 codon 439 부위의 변화를 관찰할 수 있었다.

TGF- β 1의 세포성장 억제효과가 소실되는 다른 기전으로 TGF- β 1 type I 수용체와 type II 수용체의 발현감소가 알려져 있다. Ito등은 17예 위암 세포주의 82%에서 TGF- β 1 type I 수용체의 감소를 확인하였다³⁰. Rooke등은 만성 골수구성 백혈병에서 TGF- β 1 type II 수용체의 발현감소를 관찰하였다³¹. Mackay등은 대장암 세포주에서 세포성장 억제효과가 감소된 원인으로 TGF- β 1 수용체의 발현부족을 지적하였다³². Eisma등은 47예의 두경부 편평세포암종에서 85%에서 세포주에서 TGF- β 1 type I 수용체의 발현을 관찰할 수 없었으며, 92%의 세포주에서는 TGF- β 1 type II 수용체의 발현을 관찰할 수 없어, 두경부 편평세포암종의 발암과정에 TGF- β 1 수용체의 발현감소가 영향을 주었을 것으로 추측하였다³³. Muro-Cacho등도 두경부 편평세포암종에서 암종이 진행되면서 TGF- β 1 type II 수용체의 발현감소를³⁴, Garrigue-Antar등도 식도암 세포주 21예중 29%에서 TGF- β 1 type II 수용체의 발현감소를 관찰하였다³⁵.

이 연구에서는 TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 그 결과 모든 구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 발현을 관찰할 수 있었으나, β -actin 유전자의 발현을 기준으로 보았을 때 다소 감소된 경향을 보였으며, 특히 YD-38 세포주에서는 mRNA 발현이 77%로 감소된 경향을 보였다. 그러나 Western blotting으로 T β R II의 단백질 발현을 검사한 결과 모든 세포주에서 단백질 발현을 관찰할 수 없었다. 이 연구결과로 보아 구강 편평세포암종의 발생과정에서 T β R II의 발현이 mRNA에서 단백질로 tranlation되는 과정에서 단백질 발현이 억제되어

TGF β 에 의한 성장 억제 능력의 소실로 말미암아 암종이 발생하는데 주요한 역할을 하였을 것으로 생각되며, 암종 세포주를 대상으로 TGF β 에 대한 성장 억제 효과를 관찰하는 연구를 계속 진행할 예정이다.

참고 문헌

1. Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK and Prime SS : Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 193 : 458-467, 2001.
2. Slaughter DP, Southwick HW, and Smejkal W : "field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*, 963-968, 1953.
3. Farber E : The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Res*, 44 : 4217-4223, 1984.
4. Sporn MB & Roberts AB : Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 313, 28 : 745-747, 1985
5. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, and Matsuya T : Immunohistochemical localization of epidermal growth factor(EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virch Arch Path Anat*, 418 : 349-353, 1991.
6. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X and Massague J : TGF β Signals through a Heteromeric Protein Kinase Receptor Complex. *Cell*, 71 : 1003-1014, 1992.
7. Rich JN, Borton AJ, Wang X : Transforming Growth Factor- β Signaling in Cancer. *Mic Res and Tech*, 52 : 363-373, 2001.
8. Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF and Reiss M : Missense Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor in Human Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 55 : 3982-3987, 1995.
9. Wieser R, Attisano L, Wrana JL and Massague J : Signaling Activity of Transforming Growth Factor β Type II Receptors Lacking Specific Domains in the Cytoplasmic Region. *Mol Cell Biol*, 13 : 7239-7247, 1993.
10. Massague J : Receptors for the TGF- β Family. *Cell*, 69 : 1067-1070, 1992.
11. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F & Massague J : Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 370 : 341-347, 1994.
12. Hu PP, Datto MB and Wang X : Molecular Mechanisms of Transforming Growth Factor- β Signaling. *Endocrine Rev*, 19(3) : 349-363, 1998.
13. Wakefield LM and Roberts AB : TGF- β signaling : positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Gen & Dev*, 12 : 22-29, 2002.
14. Attisano L and Wrana JL : Mads and Smads in TGF β signalling. *Cur Opin Cell Biol*, 10 : 188-194, 1998.
15. Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, Dijke P and Heldin C : Phosphorylation of Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ in the C Terminus of Smad2 Mediates Interaction with Smad4 and Is Required for Transforming Growth Factor- β Signaling. *J Biol Chem*, 272 : 28107-28115, 1997.
16. Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L and Wrana JL : T β R I Phosphorylation of Smad2 on Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling. *J Biol Chem*, 272 : 27678-27685, 1997.

17. Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, Massague J, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JKV and Markowitz S : Transforming Growth Factor- β -induced Growth Inhibition in a Smad4 Mutant Colon Adenoma Cell Line. *Cancer Res*, 61 : 256-260, 2001.
18. 김태연, 육종인, 김진 : 구강점막의 백반증과 편평상피세포암종에서 Epidermal Growth Factor Receptor 및 Transforming Growth Factor- β 1 수용체의 발현. *대한 구강병리학회지*, 31 : 1247-1255, 1997.
19. Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, Takama F, Ibuki Y, Wake N, Mogi A, Shitara Y and Takenoshita SE : Analysis of specific gene mutations in the Transforming Growth factor- β signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 60 : 4507-4512, 2000.
20. Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM and Massague J : Growth inhibition by TGF- β Linked to Suppression of Rstnobloma Protein Phosphorylation. *Cell*, 62 : 175-185, 1990.
21. Geng Y and Weinberg RA : Transforming growth factor β effects on expression of G₁ cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci*, 90 : 10315-10319, 1993.
22. Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J : Negative Regulation of G₁ in Mammalian Cells : Inhibition of Cyclin E-Dependent Kinase by TGF- β . *Science*, 260 : 536-539, 1993.
23. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV Inactivation of the Type II TGF- β Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science* 268 : 1336-1338, 1995.
24. Nakashima H, Mori M, Mimori K, Inoue H, Shibuta K, Baba K, Mafune K and Akiyoshi T : Microsatellite Instability In Japanese Esophageal Carcinoma, *Int J Cancer*, 64 : 286-289, 1995.
25. Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB and Sporn MB : Genetic changes in the transforming growth factor β (TGF- β) type II receptor gene in human gastric cancer cells : Correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- β . *Proc Natl Acad Sci*, 91 : 8772-8776, 1994.
26. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Kim Orth, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, Bang YJ, Lee HY, Park JG, Lynch HT, Roberts AB, Vogelstein B and Markowitz SD : A Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene Mutation Common in Colon and Gastric but Rare in Endometrial Cancers with Microsatellite Instability. *Cancer Res*, 55 : 5545-5547, 1995.
27. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B : Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer. *Cancer Res*, 55 : 5548-5550, 1995.
28. Wang D, Song H, Evans JA, Lang JC, Schuller DE and Weghorst CM : Mutation and downregulation of the transforming growth factor β type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, 18 : 2285-2290, 1997.
29. Garrigue-Antar L, Malabika D, Vellucci VF, et al. : The role of transforming growth factor- β receptors in cancer of the upper aero-digestive tract. In *Head and Neck Cancer-Advances in Basic Research*, Werner JA, Lippert BM, Rudent HH(eds). Elsevier Science : Amsterdam : 235-

- 252, 1996.
30. Ito M, Yasui W, Nakayama H, Yokozaki H, Ito H and Tahara E : Reduced Levels of Transforming Growth Factor-beta Type I Receptor in Human Gastric Carcinomas. *Jpn J Cancer Res*, 83 : 86-92, 1992.
 31. Rooke HM, Vitas MR, Crosier PS and Crosier KE : The TGF- β type II receptor in chronic myeloid leukemia : analysis of microsatellite regions and gene expression. *Leukemia*, 13 : 535-541, 1999.
 32. MacKay SLD, Yaswen LR, Tarnuzzer RW, Modawer LL, Bland KI, Copeland III EM and Schultz GS : Colon Cancer Cells That Are Not Growth inhibited by TGF- β Lack Functional Type I and II TGF- β Receptors. *Ann Surg*, 221 : 767-777, 1995.
 33. Eisma RJ, Spiro JD, Biberstein SE, Lindquist R, Kreutzer DL Decreased Expression of Transforming Growth Factor Beta Receptors on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumor Cells. *Am J Surg*, 101 : 641-645, 1996.
 34. Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J and Munoz-Antonia T : Expression of Transforming Growth Factor β Type II Receptors In Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 5 : 1243-1248, 1999.
 35. Garrigue-Antar L, Souza RF, Vellucci VF, Meltzer SJ, Reiss M : Loss of Transforming Growth Factor- β Type II Receptor Gene Expression in Primary Human Esophageal Cancer. *Lab Invest*, 75 : 263-272, 1996.